

Zur Genetik der Betaninurie

von

Maria-Therese Aiello

aus Berlin

1965

1967 # 117



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Zur Genetik der Betaninurie

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
M.-Th. Aiello
aus
Berlin

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan : Prof. Dr. W.-D. Keidel

Referent : Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt

Korreferent : Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung : 21.5.1965

Inhaltsverzeichnis

- I. Einleitung
- II. Problemstellung
- III. Entwicklung einer Methode zur quantitativen Betaninbestimmung im Harn
 - 1. Absorptionsmittel
 - a) Carbonate
 - b) Aluminiumoxyd
 - 2. Elutionsmittel
 - a) Wasser
 - b) Natriumchloridlösung
 - c) Natriumphosphat
 - d) Natriumbicarbonat
 - e) Natriumbisulfat
 - f) Methanol-Wassergemische
 - g) 2n Salzsäure-Methanol
 - h) 6n Salzsäure-Methanol
 - i) Durchführung von Versuchen mit betanin-haltigem Ausscheiderharn
 - 3. Entfernung der Harnpigmente aus der Säule
 - a) mechanische Entfernung der Harnpigmente
 - b) Ausschütteln des Harnes mit Äther
 - d) im sauren Milieu
 - ß) im neutralen Milieu
 - γ) im basischen Milieu
 - c) Bleiacetatfällung
 - d) Auswaschen der Säule mit einem Chloroform-Eisessiggemisch
 - 4. Bestimmung der unteren Nachweisgrenze für Betanin
 - 5. Anwendung des Verfahrens auf den Harn von Versuchspersonen
 - 6. Erweiterung der Nachweisgrenze nach unten
- IV. Durchführung von Versuchen zur Ausscheidung von Betanin nach Rote-Rüben-Genuß
 - 1. Der Verlauf der Betaninausscheidung nach Aufnahme von Roten Rüben

2. Mehrfache Bestimmung der Betaninausscheidung
über einen längeren Zeitraum in größeren zeit-
lichen Abständen
3. Tägliche Aufnahme von Roten Rüben über 47-66 Tage
4. Einfluß der Erhöhung der aufgenommenen Roten-
Rüben-Menge auf die Betaninausscheidung

V. Diskussion

VI. Die Bedeutung der Ergebnisse in genetischer und
gerichtsmedizinischer Hinsicht

VII. Zusammenfassung der Ergebnisse

VIII. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

Die gerichtliche Medizin ist stets auf der Suche nach zuverlässigen, auf genetischen Untersuchungen sich gründenden Vaterschaftsverfahren zum Ausschluß einer zu Unrecht in Anspruch genommenen Vaterschaft. Die müssen sowohl alle wissenschaftlichen Voraussetzungen erfüllen, als auch die Möglichkeit von Fehlerquellen äußerst gering halten.

Die klassischen Methoden zur Vaterschaftsbestimmung sind:

1. Das ~~anthropologische~~-erbbiologische Gutachten
2. Untersuchung der Zeugungsunfähigkeit des Mannes
 - a) Begattungsunfähigkeit
 - b) Befruchtungsunfähigkeit
3. Feststellung der Tragzeit und des Reifegrades des Kindes
4. Das serologische Gutachten, daß sich in der Hauptsache stützt auf
 - a) das ABO - System
 - b) die Rh-Gruppen
 - c) das MN-System
 - d) das Ss-System
 - e) das Kell-Systemsowie die erblichen Serumeigenschaften wie
 - f) die Haptoglobine
 - g) die Gc-Typen
 - h) die Gm-Typen.

Daneben wäre weiter zu denken an Methoden, die sich auf erblich bedingte Unterschiede im Stoffwechsel oder im Ausscheidungsmodus stützen wie

1. der Nachweis körpereigener Stoffe im Harn
 - Cystinurieformen
 - Phenylketonurie
 - Alkaptonurie
 - Galaktosämieoder
2. körperfremder Stoffe im Harn
 - Ausscheidung von Methylmercaptan im Urin nach Spargelge-
nuß und
 - Ausscheidung von Betanin nach Rote-Rüben-Genuß

Geldmacher- v. Mallinckrodt und Mendner haben gezeigt, daß nach Genuß von Roten Rüben im Harn unverändertes Betanin, der Farbstoff dieser Früchte, ausgeschieden wird. Sie warfen bereits die Frage auf, ob die Ausscheidereigenschaft zusätzlich zu verwenden sei, um die Ausschlußchancen im Vaterschaftsverfahren zu steigern.

Die von Allison und McWhirter (1956) sowie von Saldanha und Mitarbeitern (1960) angenommene erbliche Bedingtheit der Ausscheidereigenschaft, wobei der Erbgang rezessiv-autosomal sein soll, könnte bei dem relativ häufigen Vorkommen (bis zu 44%) an eine Verwendung beim Vaterschaftsausschluß denken lassen. Poertzel (1963) hat jedoch schon darauf aufmerksam gemacht, daß hierbei noch eine Reihe von Voraussetzungen erfüllt sein müssen. Dabei sind die folgenden Punkte zu beachten:

1. Muß der Erbgang des Merkmals an einem ausreichend großen Familiengut massenstatistisch hinreichend gesichert sein. Dabei soll
2. der klinische Zustand der einzelnen Versuchspersonen nach Möglichkeit als gesund zu bezeichnen sein.
3. Die Versuchsperson sollte nüchtern, die Getränkezufuhr auf ein Mindestmaß beschränkt bzw. bekannt sein; jede Medikation sollte mindestens 48 Stunden vor Versuchsbeginn abgesetzt werden, um hierdurch mögliche Fehlerquellen auszuschließen.

Die Differenzierung gegen eine durch Medikamente bedingte Rotfärbung ist besonders von Mendner eingehend untersucht worden. Daneben konnte er auch eine Rotfärbung des Harns durch Hämoglobin sicher abgrenzen.

Weiter wären zu beachten

4. Einflüsse auf die Testsubstanz (z.B. Rote Rüben) vor der Einnahme durch
 - a) Art und Rasse der Roten Rüben
 - b) Standort der Roten Rüben
 - c) physikalische Einflüsse bei der Zubereitung
 - d) chemische Einflüsse bei der Zubereitung (Wasser, Essig, Gewürze)

5. Der pH-Wert und andere Besonderheiten des Urins.
6. Große Sorgfalt ist bei der Auswertung des Tests, besonders bei der Bestimmung der Farbintensität des Urins geboten. Allison und McWhirter sowie Saldanha und Mitarbeiter hatten nur visuelle Farbvergleiche zwischen Leerurin und dem Urin 5 Std. nach einer Rote-Rüben-Mahlzeit durchgeführt. Ein zuverlässigeres, weniger subjektives Verfahren wie z.B. eine spektrophotometrische Messung wäre vorzuziehen.
7. Als letzter und wichtigster Punkt muß eine sichere Klassifizierung der Versuchspersonen in "Ausscheider" und "Nichtausscheider" möglich sein.

Eine besondere Schwierigkeit scheint in der objektiven Messung der ausgeschiedenen Betaninmenge bzw. -konzentration zu liegen. Allison und McWhirter (1956) teilen ihre Versuchspersonen in "Nichtausscheider" sowie "schwache", "mittelstarke" und "starke" Ausscheider ein. Eine ähnliche Einteilung nehmen Saldanha, Frota-Pessoa und Peixoto (1960) vor. Sie teilen durch visuellen Vergleich ihre Ausscheider in 3 verschiedene Kategorien ein:

+ = sehr schwache Färbung
++ = mittelstarke Färbung
+++ = intensiv rote Färbung.

Watson, Luke und Inall (1963) wählen die Bezeichnungen "negativ", "Spuren" sowie + und ++.

Entsprechend der subjektiven Bewertung unterscheiden sich die einzelnen Autoren auch stark in den Angaben über die Häufigkeit der Ausscheidereigenschaft unter ihren Versuchspersonen.

Während Zindler und Colovos (1950), Allison und McWhirter (1956) sowie Watson, Luke und Inall (1963) ähnliche Angaben über das Vorkommen von "Ausscheidern" machen (12,6% - 13,8%) geben Saldanha und Mitarbeiter sowie Mendner eine stark von

diesen Angaben abweichende Häufigkeit der Ausscheidereigenschaft an.

Selbstverständlich spielt für die Zuverlässigkeit der gemachten Angaben auch die Anzahl der untersuchten Personen eine Rolle. Zindler und Colovos fanden eine Betaninurie in 12,6% von 78 Versuchspersonen. Allison und McWhirter stellten bei einer Befragung von 107 Personen nur 10 Ausscheider (= 9,6%) fest. Watson, Luke und Inall (1963) geben an, daß von 58 gesunden Versuchspersonen 13,8% das Phänomen der Betaninurie zeigten. Saldanha und Mitarbeiter (1960) ermittelten eine Ausscheiderhäufigkeit von 30-44% in verschiedenen Bevölkerungsgruppen. Mendner dagegen fand bei 50 willkürlich ausgesuchten, gesunden, erwachsenen Personen sogar 37 "Ausscheider" im Sinne von Allison und auch Saldanha, das sind 90,3%. Daneben konnte er aber in den Harnen aller Versuchspersonen nach Genuß der Roten Rüben mit seiner empfindlichen säulenchromatographischen Methode Betanin nachweisen, selbst wenn der Urin bei visueller Betrachtung nicht rot gefärbt erschien. Dieses einfache und empfindliche Anreicherungs- und Testverfahren auf Betanin besteht darin, den filtrierten Harn ohne weitere Vorbereitung auf eine mit saurem Aluminiumoxyd (Guilini) gefüllte Säule zu geben. Der Farbstoff wandert dann in einer relativ scharf begrenzten blau-violetten Zone langsam nach unten, während ein Teil der normalen, gelb-braun gefärbten Harnbestandteile sich darüber anordnet und etwas langsamer wandert.

Über die Ursache für eine Betaninausscheidung im Harn nach Genuß von Roten Rüben gibt es verschiedene Annahmen. Während Allison und McWhirter sowie Saldanha und Mitarbeiter an die erbliche Bedingtheit dieses Phänomens glauben, vertreten andere Autoren wie z.B. Laur (1949) und Watson und Mitarbeiter (1963) die Meinung, daß die Betaninurie durch die Resorptionsverhältnisse im Darm maßgeblich bedingt sei. Watson, Luke und Inall vermuten, daß die Betaninausscheidung in Zusammenhang mit dem Eisenstoffwechsel, insbesondere der Eisenresorption steht. Andere Autoren wiederum (Zindler und Colovos 1950) glauben an allergische Faktoren

Während die genetische Hypothese bei hinreichender Sicherung die Verwendung des Phänomens der Betaninurie in Vaterschaftsverfahren möglich erscheinen ließ, ließen die anderen Annahmen eine solche Verwendung kaum zu.

II. Problemstellung

Wir stellten uns deshalb die Aufgabe, die Ausscheidung von Betanin im Harn nach Genuß von Roten Rüben bei gesunden Versuchspersonen qualitativ zu sichern und quantitativ zu verfolgen, um aus dem Ergebnis die Berechtigung der Annahme einer erblichen Bedingtheit kritisch zu prüfen.

Es ist offensichtlich, daß die Methode des visuellen Vergleichs der Harne von Versuchspersonen und der daraus sich gründenden Unterscheidung in Nichtausscheider und Ausscheider verschiedener Stärkegrade eine Quelle für viele Fehlbeurteilungen darstellt. Deshalb haben wir versucht, eine schnell anwendbare, einwandfrei qualitative und vor allem quantitative Bestimmungsmethode für Betanin im Harn zu entwickeln, um unter Berücksichtigung der von Poertzel (1963) aufgestellten Forderung nach zuverlässiger Klassifizierung der Versuchspersonen in Ausscheider und Nichtausscheider den angenommenen Erbgang der Betaninurie zu prüfen.

III. Entwicklung einer Methode zur quantitativen Betaninbestimmung im Harn

Angeregt durch die qualitative, säulenchromatographische Nachweismethode für Betanin im Harn von Mendner versuchten wir ein quantitatives Verfahren zur Betaninbestimmung über die Säulenchromatographie auszuarbeiten. Dabei sahen wir uns vor die Aufgabe gestellt, auf der einen Seite einen Absorbenten zu finden, der Betanin aus dem Harn einwandfrei und vollständig absorbiert und damit anreichert, und auf der anderen Seite ein Elutionsmittel zu ermitteln, mit dem das angereicherte Betanin ohne störende Beimengung von Harnpigmenten wieder zu eluieren ist, damit es dann spektrophotometrisch quantitativ bestimmt werden kann.

1. Absorptionsmittel

Zur sicheren quantitativen Bestimmung von Betanin im Harn suchten wir ein Absorptionsmittel, das drei Voraussetzungen erfüllen mußte. Es sollte Betanin

1. vollständig
2. schnell
3. als scharf begrenzte Fraktion aus dem Harn anreichern.

Hierbei konnten Vorversuche mit wässriger verdünnter Betaninlösung nicht durchgeführt werden, da bei reinem Wasser als Lösungsmittel Betanin nach Aufbringen auf die weiter unten genannten Säulenmaterialien nicht durch die Säule wanderte, sondern vielmehr oben auf dem Absorptionsmittel liegen blieb. Wir mußten unsere Versuche deshalb mit Harn durchführen, der von Personen stammte, welche längere Zeit vorher sicher keine Roten Rüben aufgenommen hatten, und dem Betanin in bekannter Menge zugefügt wurde.

Hiermit prüften wir eine Reihe von Absorbentien in der säulenchromatographischen Anordnung.

a) Calciumcarbonat

Auf ein Hinweis von Lederer und Lederer (1953) versuchten wir Betanin an Calciumcarbonat zu absorbieren. Bei Gelingen hätte dies den Vorteil geboten, daß durch schwache Säure das Carbonat gelöst worden wäre, so daß der Farbstoff unverändert hätte wiedergewonnen werden können. Versuche zeigten jedoch, daß bei Durchlaufen eines betaninhaltigen Harnes der Farbstoff sich diffus über die Säule verteilte und sich keine abgegrenzte Zone ausbildete.

Um sicher zu sein, daß Carbonate nicht als Absorptionsmittel für Betanin infrage kamen, schlossen wir an diesen Versuch zwei weitere mit Bariumcarbonat und Bleicarbonat an. Es zeigte sich, daß auch in diesen Systeme-

men Betanin nicht als abgegrenzte Fraktion wanderte.

b) Aluminiumoxyd

Wir führten sodann Versuche mit Aluminiumoxyd der Fa. Guilini durch, welches in verschiedener Basizität sowie in jeweils zwei Aktivitätsstufen angeboten wird. Bei Durchlauf von je 10 ml filtrierten, mit Betanin bis zur deutlichen Rotfärbung versetzten Harnes durch eine mit Aluminiumoxyd neutral der Aktivitätsstufe I ungefähr 10 cm hoch angefüllten Säule von 8 mm lichter Weite kam es zur Ausbildung eines breiten, schwach violetten Ringes, der langsam und verwischt nach unten wanderte. Bei Aluminiumoxyd neutral der Aktivitätsstufe II bildete sich eine schwach violette Zone aus, die sehr ausgezogen erschien und langsam wanderte.

Bei Verwendung von Aluminiumoxyd basisch der Aktivitätsstufe I trat eine diffuse, schwach violette Anfärbung der Säule auf, bei Anwendung des entsprechenden Präparates in der Aktivitätsstufe II bildete sich ein sehr breiter, kaum abgrenzbarer, schwach violett gefärbter Ring aus, der langsam und verwischt wanderte.

Das beste Ergebnis erhielten wir mit saurem Aluminiumoxyd. Bei Verwendung der Aktivitätsstufe I bildete sich sehr schnell eine scharf begrenzte, rot-violette schmale Zone von starker Farbintensität aus, die sich von den braun-gelben Harnpigmenten, die etwas langsamer wanderten, absetzte und langsam nach unten wanderte.

2. Elutionsmittel

Nachdem es gelungen war, ein Absorptionsmittel zu finden, das unseren Forderungen genügte, suchten wir nun nach einem Elutionsmittel, das geeignet sein sollte, lediglich die Betaninfraktion aus der mit Aluminiumoxyd sauer Aktivitätsstufe I gefüllten Säule zu eluieren, sodaß anschließend eine spektrophotometrische, quantitative Betaninbestimmung möglich war.

a) Wasser

Auf Grund der großen Wasserlöslichkeit des Betanins versuchten wir zunächst, die Betaninzone mit warmen und kalten Wasser zu eluieren. Doch trotz reichlicher Verwendung von Wasser kam es zu keiner Verschiebung des ausgebildeten, rot-violetten Ringes nach unten. Das Eluat blieb hell und färbte sich auch nicht geringfügig rötlich an.

b) Natriumchloridlösung

Weitere Elutionsversuche führten wir mit Natriumchloridlösung in verschiedenen Konzentrationen (1%; 2,5%; 5% und 10%) durch. Die abtropfende Lösung war zwar rötlich gefärbt, doch verblieb stets ein stark violett gefärbter Ring in der Säule. Zwischen den einzelnen Natriumchloridkonzentrationen ergab sich kein signifikanter Unterschied.

c) Natriumphosphat

Wir führten sodann Versuche mit einer Lösung von tertiärem Natriumphosphat (1; 2,5; 5; 10%) durch. Auch hier war zwar das Eluat schwach rötlich gefärbt, jedoch zeigte sich keine Aufhellung des violetten Betaninringes.

Ganz entsprechende Ergebnisse wurden mit wässrigen Lösungen von primären Natriumphosphat sowie sekundären Natriumphosphat erhalten.

d) Natriumbicarbonat

Ein entsprechendes Ergebnis brachte die Verwendung von verschieden konzentrierter Natriumbicarbonatlösung.

e) Natriumbisulfatlösung

Natriumbisulfatlösung in den genannten Konzentrationen eluierte wesentlich stärker. Das abtropfende Eluat war deutlich hellrot-violett gefärbt. Die Intensität der Lösungen nahm mit steigender Konzentration des Elu-

tionsmittels an Natriumbisulfat zu. Es konnte aber keine vollständige Entfärbung der Säule erreicht werden.

f) Methanol-Wassergemische

Nach diesen unbefriedigenden Versuchen versuchten wir die Elution des Betanins mit Methanol-Wassergemischen in verschiedenen Mischungsverhältnissen sowie mit reinem Methanol. Auch hier gelang nur ganz ungenügend die Herauslösung des Betanins.

g) 2n Salzsäure-Methanol

Nach diesen nicht voll befriedigenden Ergebnissen verwendeten wir eine Salzsäure-Methanol-Lösung, die in der von Pucher, Curtis und Vickery (1938) ausführlich beschrieben und von Mendner wieder aufgegriffenen Methode zur Anreicherung des Betanins mittels Bleiacetatfällung zur Herauslösung des Betanins aus dem Niederschlag verwendet wird.

Bei einer Mischung von 2n Salzsäure-Methanol 1:1 war das Eluat bereits kräftig rot-orange gefärbt, doch gelang es nicht, aus der Säule das Betanin völlig zu eluieren.

h) 6n Salzsäure-Methanol

Wir versuchten deshalb, ein besseres Mischungsverhältnis zu finden. Dabei gingen wir so vor, daß wir zunächst die Salzsäurekonzentration erhöhten und sodann ein Gemisch aus 6n Salzsäure und Methanol in den Mischungsverhältnissen 1:1, 1:3, 1:5 und 1:10 herstellten und zur Elution verwendeten. Es zeigte sich, daß bei Verwendung von 6n Salzsäure-Methanol im Mischungsverhältnis 1:1 die violette Betaninzone sich sehr schnell aus der Säule herauslöste, wobei verhältnismäßig wenig Elutionsmittel verbraucht wurde. In der Säule verblieb nur ein ganz geringfügiger violetter Rückstand.

Bei den Salzsäure-Methanol-Lösungen anderer Mischungsverhältnisse war der Verbrauch an Elutionsmittel etwas höher. Gleichfalls ungünstigere Verhältnisse erhielten wir mit den Mischungsverhältnissen 3:1, 5:1, 10:1.

Auch 6n Salzsäure allein wurde geprüft. Es stellt sich heraus, daß beim Durchlauf das Eluat hell-violett gefärbt war, die Violette Fraktion in der Säule wurde jedoch nicht völlig herausgelöst.

i) Durchführung von Versuchen mit betaninhaltigem Ausscheiderharn.

Nachdem die Vorversuche zur Ausarbeitung der günstigsten Bedingungen geführt hatten, führten wir Versuche mit betaninhaltigem Ausscheiderharn durch. Hierzu wurde in der folgende Weise vorgegangen:

Ein uns bereits bekannter starker Ausscheider sammelte abends eine Leerharnprobe und nahm sodann 150 g gekochte Rote Rüben zu sich. Er brachte den Leerharn sowie den Morgenharn zur Untersuchung. Von dem rotgefärbten Harn gaben wir jeweils 20 ml nach Filtration auf eine mit saurem Aluminiumoxyd 10 cm hoch gefüllte Säule (Durchmesser 8 mm). In der Säule bildete sich beim Durchlaufen des Harnes der für das Betanin charakteristische violette Ring aus.

Bei der Prüfung der Elutionsmittel zeigte sich auch hier, daß ein Gemisch aus 6 n Salzsäure und Methanol im Verhältnis 1:1 die günstigsten Ergebnisse brachte.

Als Ergebnis dieser Versuche kann festgehalten werden, daß wässrige Lösungen zur Elution ungeeignet sind, auch 6n Salzsäure oder Methanol allein sind nicht in der Lage, Betanin aus der Säule zu eluieren. Erst die Kombination dieser beiden Lösungsmittel im Verhältnis 1:1 bewirkt eine vollständige Elution des Betanin.

3. Entfernung der Harnpigmente aus der Säule

Da wir nun in dem Gemisch von 6n Salzsäure und Methanol im Verhältnis 1:1 ein geeignetes Elutionsmittel für das Auswaschen von Betanin nach seiner Isolierung aus jeweils 20 ml eines Ausscheiderharnes durch Adsorption an eine mit Aluminiumoxyd sauer gefüllte Säule gefunden hatten, führten wir Versuche durch, um auf diese Weise eine so reine Betaninlösung zu gewinnen, daß es spektrophotometrisch gemessen und anhand einer Eichkurve quantitativ bestimmt werden konnte.

Robinson und Robinson (1932), Reznik (1956) Wyler und Mitarbeiter (1959), sowie Mendner haben als Absorptionsmaximum für eine wässrige Betaninlösung den Wellenlängenbereich von 536 bis 540 nm angegeben.

Wir fanden jedoch bei 3 Versuchen zur Elution von Betanin aus Ausscheiderharn mit dem Salzsäure-Methanol-Gemisch bei anschließender spektrophotometrischer Messung (selbstregistrierendes Spektralphotometer Modell DK 2 der Fa. Beckman Instruments) nicht das für Betanin charakteristische Absorptionsmaximum bei 538 nm, obwohl das Eluat deutlich rot gefärbt war. Zweimal war in diesem Wellenlängenbereich nur eine Schulter angedeutet. Im dritten Fall lag das Absorptionsmaximum deutlich bei 490 nm.

Deshalb haben wir betaninfreien Harn in derselben Versuchsanordnung aufgearbeitet und das Eluat spektrophotometrisch untersucht. Auch hier fanden wir eine Absorptionskurve mit einem Maximum bei 490 nm. Daraus schlossen wir, daß zusammen mit Betanin eine erhebliche Menge an Harnfarbstoffen eluiert wird und daß diese in dem Meßbereich des Betanins so stark absorbieren, daß wir nicht in der Lage waren, Betanin spektrophotometrisch im Eluat überhaupt zu erkennen. Unsere nächste Aufgabe bestand deshalb darin, die störenden Harnpigmente vor der Elution mit dem Methanol-Salzsäure-Gemisch aus der Säule zu entfernen.

Wie auf Seite 10 erwähnt, hatten auch wir bei unseren säulenchromatographischen Versuchen bei Aufarbeitung von Harn über der violetten Betaninzone ebenso wie Mendner einen braun-gelben Ring beobachtet. Da auch die Säulen, durch die wir betaninfreien Harn gegeben hatten, denselben braun-gelben Ring aufwiesen, handelte es sich wohl um angereicherte Harnfarbstoffe.

a) Mechanische Entfernung der Harnpigmente.

Zunächst versuchten wir, den braun-gelben Ring zusammen mit dem darüber sich befindlichen Säulenanteil mechanisch zu entfernen, ohne die violette Zone zu verletzen. Dabei gelang uns die Entfernung nie vollständig, da sich oft die verschiedenen Zonen beim Durchlaufen des zu untersuchenden Harnes in der Säule schräg angeordnet hatten, so daß wir immer geringe Reste der Harnfarbstoffe zurücklassen mußten, um die violette Fraktion nicht zu verletzen. Bei anschließender Elution des Betanins mit Salzsäure-Methanol fanden wir deshalb auch bei vier Versuchen das Absorptionsmaximum bei 490 nm wieder deutlich ausgebildet, allerdings war nun bei 538 nm, dem für Betanin charakteristischen Absorptionsmaximum, eine Schulter in der Absorptionskurve deutlicher ausgeprägt. Damit war zwar mit der mechanischen Entfernung des braun-gelben Ringes ein großer Teil der störenden Harnpigmente beseitigt, die Entfernung reichte jedoch noch nicht aus, und wir suchten daher nach weiteren Möglichkeiten.

b) Ausschütteln des Harnes mit Äther

Wir versuchten vor der säulenchromatographischen Analyse die Harnproben durch Ausschütteln im Scheidetrichter im sauren, neutralen und alkalischen Milieu mit Äther von störenden Harnbestandteilen zu befreien.

c) Im sauren Milieu

Hierzu schütteten wir 20 ml eines filtrierten Ausscheiderharnes bei pH 3 2mal mit 100 ml Äther aus.

Nach Abtrennen der organischen Phase wurde der filtrierte Harn durch eine mit Aluminiumoxyd sauer gefüllte Säule gegeben. Nach Durchlauf des Harnvolumens war ein braun-gelber Ring nicht mehr zu erkennen. Deshalb wurde nach vollständiger Absorption des Betanins zunächst die Säule solange mit Wasser gewaschen, bis die abtropfende Lösung klar blieb. Daraufhin wurde mit 6 n Salzsäure-Methanol 1:1 eluiert und das Eluat spektrophotometrisch untersucht. Hierbei zeigte sich, daß das größte Absorptionsmaximum immer noch bei 490 nm lag, allerdings war die Schulter im Bereich von 538 nm etwas stärker ausgeprägt.

B) Im neutralen Milieu

Nunmehr stellten wir 20 ml desselben Ausscheiderharnes auf pH 7 ein und schüttelten ihn 2mal mit 100 ml Äther aus. Anschließend wurde die organische Phase entfernt, der Harn filtriert und auf die Säule gegeben. Dieses Mal bildete sich wieder über der violetten Betaninzone ein braun-gelber Ring aus. Nach Auswaschen mit Wasser und Elution mit Salzsäure-Methanol ergab die spektrophotometrische Untersuchung des Eluates eine Absorptionskurve mit einem Maximum bei 490 nm und einer schwachen Schulter bei 538 nm.

7) Im basischen Milieu

Mit einer weiteren Harnprobe sollte nun die Möglichkeit zur Entfernung der störenden Substanzen durch Ausschütteln im basischen Milieu untersucht werden. Hierbei war zu beachten, daß Betanin im alkalischen Bereich sehr schnell zerstört wird. Wir prüften deshalb die Haltbarkeit für Betanin in alkalischem Harn. Dabei stellte sich heraus, daß ein Ausscheiderharn ohne Bedenken auf einen pH-Wert von 9,5 gebracht werden kann, wenn er nach fünf Minuten wieder angesäuert wird, ohne daß dabei Betanin zerstört wird.

Aber auch das Ausschütteln bei einem pH-Wert von 9,5 mit 2mal 100 ml Äther brachte kein besseres Ergebnis.

c) Bleiacetatfällung

Da die vorherige Extraktion der Harnprobe die bei der spektrophotometrischen Untersuchung störenden Substanzen nicht entfernt hatte, versuchten wir das Betanin auf anderem Wege zu reinigen. In Anlehnung an die von Pucher, Curtis und Vickery (1938) beschriebene und von Mendner wieder aufgegriffene Bleiacetatfällung versetzten wir 20 ml des filtrierte Ausscheiderharnes mit 3 ml einer 3%-igen Bleiacetatlösung. Es bildete sich sofort ein grobflockiger blaßrosa Niederschlag, der abzentrifugiert wurde. Die überstehende Flüssigkeit hatte ihre ursprüngliche rote Farbe vollständig verloren und wurde verworfen. Der Niederschlag wurde sodann gründlich 3-4mal mit destilliertem Wasser und 2mal mit Aceton gewaschen. Anschließend wurde einmal mit 10 ml und weitere 4-5mal mit je 20 ml einer 4%igen Salzsäure-Methanol-Lösung extrahiert. Der erste Extrakt, der eine gelbe bis schmutzig orange Farbe aufwies und viele aus dem Harn stammende Verunreinigungen enthielt, wurde spektrophotometrisch gemessen. Das Absorptionsmaximum hierfür lag bei 480 nm. Die folgenden Extrakte waren hellrot-orange gefärbt. Bei der spektrophotometrischen Messung wurde das Maximum bei 486 nm und eine schwache Schulter bei 537 nm aufgezeichnet.

d) Auswaschen der Säule mit einem Chloroform-Eisessiggemisch.

Nach einer Arbeit von Grinstein (1945) über Uroporphyrine, die zum Ziel hatte, Porphyrin in reiner Form zu gewinnen, wurde gleichfalls von einem säulenchromatographischen Verfahren berichtet. Hier war es dem Autor gelungen, störende Harnpigmente durch Waschen der Säule mit Chloroform und einigen Tropfen Eisessig von dem Porphyrin getrennt aus der Säule zu eluieren.

In Anlehnung an diese Arbeit haben wir nun versucht, die Harnpigmente vom Betanin vollständig zu trennen. Dazu führten wir zunächst Versuche mit Leerharnproben durch, denen Betanin bis zur deutlichen Rotfärbung zugesetzt war. Je 20 ml hiervon wurden durch eine mit Aluminiumoxyd sauer gefüllte Säule in der bereits beschriebenen Weise gegeben. Nach völligem Abtropfen des Harnes hatte sich jedesmal ein violetter Ring ausgebildet, über dem sich die braun-gelbe Zone der Harnpigmente befand. Wir entfernten nun den größten Teil der braun-gelben Zone mechanisch, wobei wir darauf achteten, daß der violette Ring nicht beschädigt wurde. Anschließend spülten wir die Säule 2mal mit einem Gemisch von 10 ml Chloroform, denen 2 ml Eisessig zugesetzt war, durch. Dabei tropfte ein deutlich gelbes Eluat ab, die braun-gelbe Schicht oberhalb der Betaninfraktion wurde völlig entfärbt. Der violette Ring blieb unbeeinflusst. Um den Waschvorgang der Säule mit Chloroform-Eisessig zu beschleunigen, haben wir die Säule an eine Saugpumpe angeschlossen. Im Anschluß an das Auswaschen der Säule erfolgte die Elution der violetten Zone mit Salzsäure-Methanol. Auch dieser Vorgang wurde durch Anschluß an eine Saugpumpe beschleunigt. Sobald der erste ablaufende Tropfen rötlich violett gefärbt war, wurde das Eluat in ein gesondertes Gefäß aufgefangen, bis die violette Zone vollständig aus der Säule verschwunden war, und das Eluat farblos abtropfte. Die jeweils erhaltene Eluatmenge wurde notiert. Sodann wurde die Absorptionskurve der Lösung aufgenommen. Nunmehr war in jedem der 10 Versuche eine Absorptionskurve mit einem Maximum bei 534 bis 538 nm festzustellen, wobei in 4 Proben zusätzlich noch eine Schulter bei 480 bis 507 nm registriert wurde. Dies zeigte an, daß durch das Auswaschen der Säule mit einem Gemisch von Chloroform und Eisessig im Anschluß an die mechanische Entfernung die störenden Harnfarbstoffe weitgehend beseitigt werden konnten.

4. Bestimmung der unteren Nachweisgrenze für Betanin.

Im Anschluß hieran prüften wir, welche Betaninmenge wir mit dem entwickelten quantitativen, säulenchromatographischen Verfahren bei Zusatzversuchen noch bestimmen konnten.

Hierzu stellten wir uns aus Leerharn Proben her, die 500, 300, 200, 100, 75, 50 und 25 γ Betanin in 20 ml enthielten. Die Proben wurden je auf eine mit Aluminiumoxyd sauer gefüllte Säule gegeben. Nach Durchlaufen wurde der braun-gelbe Ring der Harnpigmente mechanisch entfernt und die Säule mit einem Gemisch von 10 ml Chloroform und 2 ml Eisessig durchgespült. Anschließend erfolgte die Elution des Betanins mit Salzsäure-Methanol. Die Menge des erhaltenen, rotgefärbten Eluates wurde notiert, sodann wurde die Betaninkonzentration spektrophotometrisch unter Benutzung einer Eichkurve (Abb. 1) bestimmt. Hierbei zeigte sich, daß bei Einsatz von 500, 300, 200 und 100 γ bei dreimaliger Wiederholung der Versuche jeweils nur die Hälfte der eingesetzten Betaninmenge nach dem oben geschilderten Verfahren zurückgewonnen werden konnte. Die Ursache hierfür konnten wir nicht klären. Bei den Versuchen mit Zusatz von 75, 50 und 25 γ Betanin konnte spektrophotometrisch keine Ablesung im Bereich von 538 nm mehr gemacht werden. Das Absorptionsmaximum lag wieder bei 490 nm.

Auf die geschilderte Weise waren wir also im Stande, bis zu einem Betaningehalt von 100 γ in 20 ml Harn eine Betaninbestimmung quantitativ durchzuführen.

5. Anwendung des Verfahrens auf den Harn von Versuchspersonen.

Wir führten Versuche mit insgesamt 8 Personen durch. Diese mußten früh nüchtern 250 g Rote Rüben zu sich nehmen, nachdem sie zuvor Leerharn gesammelt hatten, und dann stündlich bis mindestens zur 6. Stunde nach der Mahlzeit eine Harnprobe liefern. Den Harn untersuchten wir quanti-

tativ auf Betanin, wobei wir in der bereits beschriebenen Weise vorgingen. Hierbei mußten wir aber feststellen, daß bei allen Harnproben der 8 Versuchspersonen trotz z.T. erheblicher Rotfärbung der Betaningehalt in 20 ml Harn offensichtlich unter 100 γ liegen mußte, weil sich zwar ein Betaninring in der Säule ausbildete, bei der spektrophotometrischen Untersuchung aber kein Maximum bei 538 nm festzustellen war. Damit war keine quantitative Auswertung möglich, das Verfahren war für unsere Zwecke zu unempfindlich.

6. Erweiterung der Nachweisgrenze nach unten.

Wir mußten deshalb versuchen, daß Nachweisverfahren für Betanin auf kleinere Mengen als 100 γ zu erweitern. Deshalb haben wir auf eine exakte quantitative Bestimmung verzichtet und eine halbquantitative Methode gewählt. Dabei gingen wir in der folgenden Weise vor:

Wir stellten uns aus Leerharn durch Betaninzusatz Harnproben her, die 150, 100, 75, 50, 25 und 14 γ Betanin in 20 ml enthielten. Jede Harnprobe wurde auf die Aluminiumoxyd sauer gefüllte Säule gegeben. Es wurde nun die Menge des Harnes festgestellt, die durchlaufen mußte, bis der violette Betaninring zum erstenmal deutlich sichtbar war. Die hierzu erforderliche, durchgelaufene Harnmenge wurde für jede Probe wiederholt bestimmt. Den für jede oben erwähnte Betaninmenge erhaltenen Mittelwert in ml haben wir gegen die Betaninmenge in ein Koordinatensystem eingetragen und somit eine Eichkurve aufgestellt, anhand derer wir nun halbquantitativ eine recht empfindliche Betaninbestimmung ausführen konnten (Abb. 2). Die Nachweisgrenze lag bei etwa 14 γ Betanin in 20 ml Harn.

Da aus der Eichkurve nur die Betaninmenge in 20 ml Harn abzulesen war, mußten wir, um den Gesamtbetaningehalt einer Harnprobe zu berechnen, auf die gesamte ausgeschiedene Harnmenge umrechnen.

IV. Durchführung von Ausscheidungsversuchen.

Aus den Berichten von Zindler und Colovos (1950), Allison und McWhirter (1956), Saldanha und Mitarbeitern (1960) sowie Watson, Luke und Inall (1963) kann man entnehmen, daß das Phänomen der Rotfärbung des Harnes nach Genuß von Roten Rüben im allgemeinen nur einmal bei ein und derselben Person geprüft worden war. Allerdings beobachtete Allison und McWhirter, daß bei manchen "Ausscheidern" der rote Farbstoff nur intermittierend erscheint. Auch unter Saldanhas Versuchspersonen war "ein Kind, daß sich von minus zu plus geändert hatte". Ebenso geben Watson, Luke und Inall an, daß einige "positive Versuchspersonen bei einer weiteren Prüfung ein negatives Ergebnis" gezeigt hätten.

Daraus ergibt sich schon, daß aufgrund einer jeweils nur einmal durchgeführten Harnuntersuchung, auch wenn diese an einem noch so großen Material durchgeführt wird, keine gültigen Aussagen über einen etwaigen Erbgang gemacht werden können. Daher scheint uns die Forderung berechtigt zu sein, das Phänomen der Betaninurie nach Genuß von Roten Rüben wiederholt an ein und derselben Person zu untersuchen.

Daneben mußte auch geprüft werden, ob die von Saldanha gewählte Anordnung der Auswertung einer Harnprobe 5 Std. nach erfolgter Rote-Rüben-Mahlzeit zu sicheren Ergebnissen führen konnte. Deshalb stellten wir in einer größeren Anzahl von Versuchen auch fest, zu welchem Zeitpunkt nach der Rote-Rüben-Mahlzeit im allgemeinen die Ausscheidung des Betanins im Harn ihren Höhepunkt erreicht hat bzw. wann sie beendet ist.

1. Der Verlauf der Betaninausscheidung nach Aufnahme von Roten Rüben.

Wir führten Untersuchungen an 14 willkürlich ausgewählten gesunden Personen im Alter von 14 bis 47 Jahren

durch, worunter sich zwei Frauen und zwölf Männer befanden. Dabei gingen wir in der folgenden Weise vor:

Die Versuchsperson sammelte am Morgen eine Leerurinprobe, sodann nahm sie nüchtern 250 g gekochte Rote Rüben zu sich. Anschließend wurde von der Versuchsperson in stündlichen Abständen, wenn möglich bis zu 8 Stunden, Harn gesammelt, und der pH-Wert festgestellt. Sodann wurden in der auf Seite 20 geschilderten Weise die Harnproben quantitativ auf ihren Betaningehalt geprüft. Die gefundene Betaninmenge wurde auf die gesamte stündlich ausgeschiedene Harnmenge umgerechnet. Dabei stellte sich heraus, daß wir bei allen untersuchten Personen nach Genuß von Roten Rüben Betanin im Harn ohne Schwierigkeiten quantitativ nachweisen konnten, was in Tabelle 1 zum Ausdruck kommt. Man ersieht daraus weiter, daß bei den einzelnen Personen das Maximum der Betaninausscheidung zeitlich unterschiedlich lag. Wir stellten hierfür Werte zwischen 1 bis 4 1/2 Std. fest.

In drei Fällen war es möglich, die Ausscheidung über 8 Std. hinaus zu verfolgen. Hier konnte noch nach 13 bzw. 18 Stunden Betanin im Harn nachgewiesen werden.

2. Mehrfache Bestimmung der Betaninausscheidung über einen längeren Zeitraum in größeren zeitlichen Abständen.

Anschließend führten wir wiederholte Betaninbestimmungen bei einigen der Versuchspersonen in größeren zeitlichen Abständen durch. Die Abstände wurden so gewählt (mindestens 8 Tage), daß eine etwa auftretende Fermentadaptation unwahrscheinlich erschien.

Ein klassisches Beispiel für eine Fermentadaptation bietet die Laktase. Sie ist ein Ferment, welches besonders im Darmsaft vorkommt und den Milchzucker in die Monosaccharide spaltet. Laktase ist nur dann im

Tabelle 1

	Perso- nen	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9.
8 Betanin bezo- gen auf die je- weilig ausge- schiedene Harn- menge	A	295	270	136						
	B	148	108	69	98	39	39	39		
	C	117	608	456	150	62	62	62		
	D	158	600	458	326	306	306	306	306	3
	E	158	262	296	292	232	232	232	48	
	F		210	115	82	82	105	105	105	
	G	0	82	86	35	0				
	H	0	115	240	126	92	58	58		
	J	0	25	82	92	54	54			
	K	0	0	100	80		0			
	L		65	48	15	15	0			
	M		0		58	46			0	
	N		100	92		48				
	O	0	0	0	0	0	0	0		

Betaninausscheidung nach einer einmaligen Aufnahme von
Roten-Rüben bei 14 Personen.

Darmsaft zu finden, wenn mit der Nahrung milchzuckerhaltige Stoffe wie z.B. Milch regelmäßig und über einen größeren Zeitraum hinweg zugeführt werden (Lehnhartz 1959).

Für die Wiederholungsversuche hatten wir zwei Gruppen aufgestellt. Die eine Gruppe bestand aus drei Personen, die wir in fünf mindestens 1 Woche auseinanderliegenden Versuche getestet haben, die 2. Gruppe bestand aus 5 Personen, die wir je 3mal in größeren zeitlichen Abständen untersuchten. Die Versuche wurden in der bereits beschriebenen Weise durchgeführt.

Aus Abb. 4 und 5 ist leicht abzulesen, daß bei ein und derselben Person das Ausscheidungsmaximum zeitlich relativ starken Schwankungen unterliegt (2 1/2 bis 4 1/2 Stunden, 2 bis 4 1/4 Stunden und 2 bis 4 1/4 Std.).

Weiter zeigte sich, - was im Hinblick auf eine genetische Auswertung sehr wichtig erscheint, - daß zwei Versuchspersonen, die bei der 1. Untersuchung nach unserem halbquantitativen Verfahren als Nichtausscheider eingestuft worden waren, bei der 2. und 3. Untersuchung verhältnismäßig viel Betanin ausschieden (Abb. 5d, e).

3. Tägliche Aufnahme von Roten Rüben über 47 - 66 Tage.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde bei 3 Personen die Ausscheidung von Betanin im Harn bei einer täglichen Rote-Rüben-Mahlzeit über mindestens 47 Tage geprüft. Diese Versuche führten wir u.a. durch, um festzustellen, ob bei der Ausscheidung des Betanins ein Ferment eine Rolle spielt, welches das Betanin im Blut abbaut und so das Bild des Nichtausscheiders hervorrufen könnte.

Betaninausscheidung bei fünfmaliger Rote-Rüben-Aufnahme
im Abstand von mindestens 8 Tagen.

Tabelle 2

für Person A.

		1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.
1. Versuch	γ Betanin bezo-	0	0	-	56	-	32	-	0
2. Versuch	gen auf die je-	0	0	-	20	0	0	0	
3. Versuch	weils ausgesch.	106	216	324	206	56	38	30	25
4. Versuch	Harnmenge	-	-	290	150	72	65	46	26
5. Versuch		120	242	366	160	36	0		
6. Versuch		30	62	74	66	48	30	10	

Tabelle 3

für Person B.

		1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.
1. Versuch	γ Betanin bezo-	72	148	122	132	48	44	35	34
2. Versuch	gen auf die je-	156	262	298	244	232	232	232	
3. Versuch	weilige Harn-	150	150	172	104	104			
4. Versuch	menge	34	68	60	110	54	48		
5. Versuch		0	74	148	0	0			

Tabelle 4

für Person C

		1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.
1. Versuch	γ Betanin bezo-	32	176	140	66	105	0		
2. Versuch	gen auf die je-	0	15	0	0	0			
3. Versuch	weilige Harn-	0	28	48	70	60	24		
4. Versuch	menge	32	41	84	116	64			
5. Versuch		22	48	64	88	84	42		

Betaninausscheidung bei dreimaliger Rote-Rüben-Aufnahme
im Abstand von mindestens 8 Tagen.

Tabelle 5

		1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.
Versuch	γ Betanin bezo-	30	60	60	50	14	0	0
Versuch	gen auf d.jewei-	34	70	65	65			
Versuch	lige Harnmenge	150	115	150	85	180		

Tabelle 6

		1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.
Versuch	γ Betanin bezo-	130	325	400	260				
Versuch	gen auf d.jewei-	115	610	450	150	65	65		
Versuch	lige Harnmenge	80	100	225	330	100	100	100	

Tabelle 7

		1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.
Versuch	γ Betanin bezo-	18	80	70	22	5	
Versuch	gen auf d.jewei-	40	105	55	0		
Versuch	lige Harnmenge	250	384	400	110		

Tabelle 8

		1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.
Versuch	γ Betanin bezo-	0	0	0	0	0	0	
Versuch	gen auf d.jewei-	10	25	52	60	90	70	
Versuch	lige Harnmenge	0	110	175	140			

Tabelle 9

		1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.
Versuch	γ Betanin bezo-	0	0	0	0			
Versuch	gen auf d.jewei-	0	0	0	0			
Versuch	lige Harnmenge	150	110	75	98	38	38	

Die Versuchsanordnung wurde geringfügig abgeändert derart, daß die 3 Versuchspersonen jeden Abend nach Entleerung der Blase 125 g gekochte Rote Rüben zu sich nahmen, und jedesmal am nächsten Morgen den gesamten Nachtharn zur Untersuchung brachten. Der Zeitraum zwischen der Einnahme der Roten Rüben und dem Auffangen des Nachtharnes bewegte sich immer zwischen 8 und 10 Std. Auch am Abend vor Sonn- und Feiertagen wurden regelmäßig 125 g gekochte Rote Rüben eingenommen, so daß die Zufuhr konstant blieb. Allerdings wurde an diesen Tagen eine quantitative Betaninbestimmung nicht durchgeführt.

Wieder wurden die Harnmenge, die Betaninkonzentration, sowie die Gesamtbetaninmenge (Tabellen 10,11,12) bestimmt. Alle Werte wurden in Abhängigkeit von der Zeit in ein Koordinatensystem eingetragen

Wie hieraus zu entnehmen ist, besteht keinerlei Gesetzmäßigkeit in der Betaninausscheidung, noch ist, wenigstens in diesem von uns verfolgten zeitlichen Abschnitt, eine adaptive Fermentreaktion zu beobachten. Bei Abb. 8 ist zu erkennen, daß am 49. und 50. Tag des laufenden Versuches kein Betanin im Harn nachzuweisen war. Dies hätte als eine adaptive Fermentreaktion gedeutet werden können, wenn zu diesem Zeitpunkt der Versuch abgebrochen wäre. Weitere Aufnahme von Roten Rüben brachte aber in den nächsten 16 Tagen eine steil ansteigende Betaninausscheidung, wobei sogar Betaninmengen erreicht wurden, wie nie zuvor bei diesem Versuchsteil. Damit dürfte wohl die Möglichkeit einer adaptiven Fermentreaktion ausgeschlossen werden können.

4. Einfluß der Erhöhung der aufgenommenen Roten-Rüben-Menge auf die Betaninausscheidung.

Die unter 3. genannten Langzeitversuche haben wir damit abgeschlossen, daß jede Versuchsperson am letzten Abend anstelle der gewohnten 125 g Roten Rüben die

Betaninausscheidung bei täglicher Rote-Rüben-Aufnahme
über 47 bis 66 Tage.

Tabelle 10

Gesamtharn ml	Gesamt- γ
5	745,5
7	621
0	499,5
0	737
0	738
2	742,5
0	877,5
0	546
0	630
0	900
5	427,5
0	637,5
0	900
0	610,5
0	1039,5
0	1080
5	1006
5	1035
0	425
0	882
0	360
5	645
0	544,5
0	528
5	388,5
0	825
0	741
0	911
0	580
0	585,5
0	931
5	499,5
5	721,25
0	567
0	1125
0	665
0	1000
0	960
0	225

Tabelle 11

Gesamtharn ml	Gesamt- γ
490	588
250	625
460	966
230	483
300	750
265	993,75
440	374
240	900
325	682,5
405	405
300	900
270	513
270	405
265	225
315	945
445	337
330	495
230	621
280	483
195	731,25
185	555
240	540
320	720
330	577,5
300	630
240	420
440	770
385	1155
400	900
240	744
420	882
185	693,75
165	346,5
180	378
285	498,75
410	1230
245	551,25
200	750
330	990
380	1425
360	1080
180	405
290	725
330	577,5
280	420
400	760
270	1350
300	750
210	525
250	750
230	977,5

Tabelle 12

Gesamtharn ml	Gesamt- γ
420	1050
475	932,5
460	805
570	997,5
580	1218
670	1467
400	1080
510	1147,5
430	408,5
450	1350
600	1800
570	1539
525	446
400	540
475	641,25
390	526,5
430	365,5
580	551
440	484
540	945
620	1178
435	746
285	598,5
580	1015
400	660
355	532,5
420	1050
520	988
490	857,5
515	1081,5
290	725
435	1174,5
490	0
830	0
520	780
290	435
310	1038,5
580	2175
390	1053
480	1440
470	1057,5
600	3480
520	2210

dreifache Menge, also 375 g zu sich nahm und sodann den während der Nacht gesammelten Harn wie üblich zu Untersuchung brachte. Wir führten diese Versuche durch, um einen Hinweis darauf zu gewinnen, ob die Betaninausscheidung mit der Zufuhr an Roten Rüben parallel geht.

Es ergibt sich, daß nur ein sehr geringfügiger oder überhaupt kein Anstieg der ausgeschiedenen Betaninmenge zu verzeichnen war, so daß offensichtlich die Aufnahme der dreifachen Rote-Rüben-Menge ohne Wirkung blieb.

V. Diskussion

Überblickt man noch einmal die Ergebnisse der durchgeführten Versuche, so erscheint es zunächst bedeutungsvoll, daß über die Hälfte der Harnproben, die quantitativ bestimmbare Betaninmengen enthielten, sich visuell nicht von Leerharnen unterschieden, und daß sich 2 Personen 2mal und 2 Personen 1mal im Verlauf der Untersuchungen als "Nichtausscheider" erwiesen haben, obwohl sie vor und nach diesem Zeitpunkt erhebliche Betaninmengen im Harn ausschieden. Schließlich ist zu beachten, daß alle in unseren Versuchen getesteten insgesamt 14 Personen grundsätzlich in der Lage waren, Betanin im Harn auszuschcheiden, wenn dies auch an einzelnen Tagen nicht eintrat.

Über die Hälfte der Harnproben zeigte nicht das Phänomen der Rotfärbung, obwohl in ihnen mit der halbquantitativen Methode Betanin festgestellt werden konnte. Dies dürfte eine Erklärung finden durch die zu geringe Betaninkonzentration im Harn, was nicht gleichbedeutend ist mit der Ausscheidung einer geringen Gesamtbetaninmenge, wie sich z.B. aus Abb. 8, 20.-29. Tag, ergibt.

Daß bei einem über einen längeren Zeitraum beobachteten Ausscheider plötzlich für 1 oder 2 Tage kein Betanin im Harn nachzuweisen war, könnte seine Erklärung in dem schon von Mendner erwähnten Umstand finden, daß Betanin im alkalischen Harn (wie überhaupt im alkalischen Milieu) seinen roten Farbton verliert und einen gelben Farbton annimmt. Nach einiger Zeit tritt Zersetzung des Moleküls ein. Wir haben aber regelmäßig bei den Untersuchungen der Harne den pH-Wert gemessen, der sich immer innerhalb von 5-6,5 bewegte, so daß ein alkalischer pH-Wert als Ursache für das Fehlen des Betanins im Harn auszuschließen ist. Möglich wäre dagegen, daß die Konzentration des ausgeschiedenen Betanins zu gering war, um mit unserer Methode erfaßt zu werden.

Die Beantwortung der Frage, warum quantitative Unterschiede der Betaninausscheidung bei ein und derselben Person nach Genuß von jeweils derselben Menge Roter Rüben auftreten, kann möglicherweise in der sehr interessanten Hypothese von Watson, Luke und Inall liegen. Diese Autoren sind der Ansicht, daß das Phänomen der Betaninurie zum großen Teil, wenn nicht ganz, eine Frage der Resorption ist. In Einklang stehen Versuche von Watson (1963) der zeigen konnte, daß bei Ratten und beim Menschen injiziertes, also unter Umgehung von Magen und Darm beigebrachtes Betanin zu 75% aus dem Harn zurückzugewinnen ist.

Watson, Luke und Inall beobachteten das Phänomen der Betaninurie besonders häufig bei Patienten, die unter Eisenmangel litten. Eisengabe brachte die Erscheinung zum Verschwinden. Das führte die Autoren zu der Annahme, daß Betanin über den Eisenresorptionsmechanismus aufgenommen wird, wobei Eisen und Betanin in einer kompetitiven Beziehung zu einer Akzeptor

Substanz, welche Apoferritin sein könnte, stehen. (Apoferritin ist ein eisenfreier Eiweißkörper, welcher durch Anlagerung von Eisen III zu Ferritin wird. Ferritin spielt bei der Resorption von Eisen eine bedeutende Rolle. Solange Apoferritin noch nicht mit Eisen gesättigt ist, wird Eisen von der Darmschleimhaut aufgenommen. Ist alles Apoferritin in Ferritin übergeführt, so stockt die Eisenresorption, weil nun kein Konzentrationsgefälle mehr besteht (Lehnhartz 1959).

Wenn wir nun diese Tatsache und die oben aufgeführten Angaben von Watson, Luke und Inall im Zusammenhang mit unseren Versuchsergebnissen betrachten, könnte man die von uns festgestellten qualitativen Unterschiede in der Betaninausscheidung bei ein und derselben Person nach stets derselben Zufuhr an Roten Rüben der physiologischerweise fluktuierenden Eisenresorption zuschreiben, wobei der nicht mit Eisen abgesättigte Anteil des Apoferritin zur Resorption von Betanin zur Verfügung stände. Im Falle der Nichtausscheidung von Betanin hätte dann gerade kein Apoferritin zur Verfügung gestanden.

Für die Beteiligung eines adaptiv gebildeten Fermentes bei Aufnahme und Ausscheidung von Betanin konnten wir keinen Anhaltspunkt gewinnen.

VI. Die Bedeutung der Ergebnisse in genetischer und gerichtsmedizinischer Hinsicht.

Unsere Aufgabe war es, den von Allison und McWhirter (1956) sowie Saldanha und Mitarbeitern (1960) angenommenen Erbgang der Betaninurie und den von ihnen geprägten Begriff des "Nichtausscheiders" unter quantitativen Gesichtspunkten erneut zu prüfen. Aus unseren Versuchsergebnissen geht eindeutig hervor, daß die Fähigkeit zur Ausscheidung von Betanin im Harn

nach Genuß von Roten Rüben keine konstante Eigenschaft eines bestimmten Individuums ist. Es sind vielmehr bei ein und derselben Person bei Beobachtung über einen längeren Zeitraum starke Schwankungen zu verzeichnen sowohl hinsichtlich der Betaninkonzentration als auch der ausgeschiedenen Gesamtbetaninmenge. Alle untersuchten Personen (insgesamt 14) schieden bei Wiederholung der Untersuchung Betanin aus. Es ist selbstverständlich, daß ein Phänomen, welches schon bei ein und derselben Person so erheblichen Schwankungen unterliegt, und darüber hinaus bei jedem zu beobachten ist, kaum genetisch bedingt sein kann. Es scheidet daher für Vaterschaftsuntersuchungen aus.

Innerhalb der Gerichtsmedizin kann die Betaninurie vielleicht für die Kriminalistik eine Rolle spielen. Ist im Harn einer Person Betanin nachweisbar, so hat der Betreffende vermutlich innerhalb der letzten 24 Std. Rote Rüben gegessen. Dabei muß man allerdings berücksichtigen, daß Betanin nicht nur in Roten Rüben enthalten ist, sondern daß auch durch Genuß von anderen Pflanzenteilen wie der Kermesbeere, der roten Variante der Gartenmelde und der Opuntien u.U. Betanin im Harn ausgeschieden werden könnte, da diese Angehörige der großen Gruppe der Centrospermen gleichfalls Betanin enthalten (Reznik 1955).

VII. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Als Absorptionsmittel für die Anreicherung von Betanin aus Harn wurde geprüft: Calciumcarbonat, Bariumcarbonat, Bleicarbonat sowie die Präparate Aluminiumoxyd basisch (Aktivitätsstufe I und II), neutral (Aktivitätsstufe I und II) sowie sauer (Aktivitätsstufe I). Es zeigte sich eindeutig, daß das Präparat Aluminiumoxyd sauer, Aktivitätsstufe I das Absorbens darstellt, welches Betanin aus dem Harn vollständig und schnell und auf dem engsten Raum anreichert.

2. Um das so angereicherte Betanin aus der Säule zu eluieren, prüften wir eine Reihe von Lösungsmitteln, nämlich Wasser, sowie Lösungen von Natriumchlorid, primären, sekundären und tertiären Natriumphosphat, Natriumbicarbonat, Natriumbisulfat und Salzsäure in verschiedener Konzentration, daneben Methanol, ein Wasser-Methanol-Gemisch und schließlich Gemische aus Salzsäure (in verschiedener Konzentration) und Methanol in verschiedenen Mischungsverhältnissen. Hierbei erwies sich ein Gemisch von 6n Salzsäure und Methanol im Verhältnis 1:1 als am besten geeignet.
3. Da Harnbestandteile die spektrophotometrische Betaninbestimmung im Eluat erheblich beeinträchtigen, versuchten wir diese zu entfernen. Unzureichend war die vorherige Extraktion des Harnes mit Äther im sauren, neutralen und basischen Milieu, ebenso die Bleiacetatfällung des Betanins. Die mechanische Entfernung der gelben Harnbestandteile gelang nur zum Teil. Eine praktisch völlige Entfernung wurde erreicht durch Elution mit einem Gemisch von 10 ml Chloroform und 2 ml Eisessig. Hiermit wurde die Säule so weitgehend von störenden Harnpigmenten befreit, daß bei Zusatzversuche eine einwandfreie spektrophotometrische Messung des Betanin nach Elution bis zu einer Konzentration von etwa 100 γ pro 20 ml möglich war.
4. Zur Betaninbestimmung in Ausscheiderharnen reichte diese Empfindlichkeit nicht aus. Deshalb haben wir eine halbquantitative säulenchromatographische Methode entwickelt, mit der wir in der Lage sind, Betanin bis zu einer Konzentration von 14 γ in 20 ml Ausscheiderharn zu erfassen.

5. Um den Begriff des Nichtausscheiders unter quantitativen Bedingungen zu formulieren und somit den angenommenen Erbgang der Betaninurie zu prüfen, haben wir eine Reihe von Versuchen durchgeführt, wobei 14 willkürlich ausgewählte gesunde Personen im Alter von 14 bis 47 Jahren einmal, 5 Personen hiervon dreimal und drei Personen hiervon fünfmal in systematischen stündlichen Verlaufsuntersuchungen mit quantitativer Betaninausscheidung nach Rote-RübenGenuß untersucht wurden. Bei 3 Personen wurde die Betaninausscheidung im Harn über einen Zeitraum von 47-66 Tagen bei täglichem Rote-RübenGenuß quantitativ verfolgt. Dabei zeigte es sich, daß alle von uns untersuchten Personen Betanin im Harn nach Genuß von Roten Rüben ausschieden, wobei das Ausscheidungsmaximum einer jeden Person individuellen Schwankungen bezüglich der Zeit und der Konzentration unterlag. Hieraus waren jedoch keinerlei Gesetzmäßigkeiten abzuleiten.
6. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die Ausscheidung von Betanin nach Rote-Rüben-Genuß, da sie bei allen untersuchten Personen erfolgte und stark schwankte, kaum genetisch bedingt sein kann. Damit ist die Bestimmung der Betaninausscheidung für Vaterschaftsverfahren ungeeignet. Sie kann allerdings Bedeutung erlangen in der Kriminalistik, wo bei Nachweis von Betanin im Harn auf die Aufnahme von Roten Rüben etwa innerhalb der letzten 24 Stunden geschlossen werden kann.

VIII. Literaturverzeichnis

- Ainley, A.D. and R. Robinson
Nitrogenous Anthocyanins, Part III,
Preliminary Experiments with Betanidin
J.ChemSoc (London), 446, 1937, I
- Allison, A.C. and K.G.McWhirter
Two Unifactorial Characters for which Man is Polymorphic.
Nature 178, 748, 1956
- Geldmacher-v. Mallinckrodt, M.
Vortrag auf der 8.Tagung der Deutschen Gesellschaft für
Anthropologie vom 12-14.September 1963 in Köln
- Grinstein, M., S. Schwartz and C.J. Watson
Studies of the Uroporphyrins
J.of.Biol.Chem, 157, 323, 1945
- Köhler, W.
Über den Farbstoff der Roten Rüben
Dissertation Heidelberg, 1953
- Laur, A.
Erythurie nach Roten-Rüben-Genuß
Klinisch-experimenteller Beitrag zum Problem der
Darmresorption
Dts. Archiv für klin. Medizin, Bd. 196, 466-485 (1949)
- Lederer E. and M.Lederer
Chromatography
S. 19, Elsevier Publishing Company, 1953
- Lehnhartz, E.
Chemische Physiologie, S. 303
Springer-Verlag 1959
- Mendner, K.
Die Betaninurie
Nachweis und gerichtsmedizinische Bedeutung
Dissertation Erlangen-Nürnberg, 1965

Poertzel, Ch.

Zur Frage der erbbiologischen Bedeutung der Ausscheidung
des Farbstoffes der Rötten Rübe im Harn.

Dissertation Erlangen-Nürnberg, 1963

Pucher, G.W., L.C. Curtis, H.B. Vickery

The Red Pigment of the Root of the Beet (*Beta vulgaris*)

Part I, J.Biol.Chem. 123, 61, 1938; Part II, J.Biol.Chem.

123, 71, 1938

Reznik, H.

Untersuchung über die physiologische Bedeutung der
chymochromen Farbstoffe.

Sitzungsberichte der Heidelberger Akademie der Wissenschaften

Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse, Jahrgang 1956,

2. Abhandlung, S. 125 - 217

Reznik, H.

Die Pigmente der Centrospermen als systematisches Element.

Zeitschr. f. Botanik 43, 499 (1955)

Robinson, A.M. and R. Robinson

Synthetical Experiments on the Nature of Betanin and

Related Nitrogenous Anthocyanins

Part I., J. Chem.Soc. (London), 1439, 1932

Saldanha, P.H., O. Frota-Pessoa and L.J.S. Peixoto

Genetik des Betanin-Ausscheidung bei holländischen Ein-
wanderern in Brasilien,

Aus Second International Conference of Human Genetics,

Rome 1961, D 221

Watson, W.C., R.G. Luke and J.A. Inall

Beeturia: Its Incidence and a Clue to its Mechanism

Brit. Medic. Journal, Okt. 19, Numb. 5363, 971, 1963

Wyler, H. und A.S. Dreiding

Kristallisiertes Betanin

vorläufige Mitteilung, Helv.Chim.Acta 40, Fasc. I., 191

1957

Zindler, G.A. and G.C. Colovos
Anthocyaninuria and Beet Allergy,
Ann.Allergy, 8, 603 (1950)

Zum Schluß der Arbeit möchte ich Frau Priv.-Doz.
Dr.Dr. M. Geldmacher-v. Mallinokrodt für die Über-
lassung des Themas und die ständige Hilfsbereit-
schaft sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.Dr.E.Weinig
für die stete Förderung während der Durchführung
der Arbeit.

Lebenslauf

Ich, Maria-Therese Aiello geb. Wegner, bin das erstgeborene Kind des Dipl.-Ing. Konrad Wegner und seiner Frau, Margarete Wegner geb. Weiß, und erblickte am 29.11.1936 im Paulinen-Haus zu Berlin das Licht der Welt. Die ersten Jahre meines Lebens verbrachte ich in Berlin, bis meine Eltern 1940 nach Seefeld i.Tirol umzogen. Dort trat ich 1943 in die Volksschule ein, die ich bis 1945 besuchte. 1945 wurden wir aus Seefeld i.Tirol ausgewiesen. Meine vier Geschwister und ich kamen zunächst in einem Waisenhaus in München unter, wo ich die Volksschule an der Amalienstr. 36 (1945-1946) besuchte. 1946 siedelten meine Eltern mit uns nach Düsseldorf um, wo ich noch 1 Jahr auf die Volksschule ging. Nach der 4. Klasse trat ich in das Gymnasium der Goethe-Schule ein. Im Mai 1949 siedelten wir nach Nürnberg über, wo ich das Neue Gymnasium am Frauentorgraben bis 1953 besuchte. Juli 1953 zogen meine Eltern mit uns nach Erlangen, wo ich am Gymnasium Fridericianum am 17.Juli 1958 das Abitur bestand. Am 21. Oktober 1958 habe ich mich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen immatrikuliert für die medizinische Fachrichtung. Am 31.Juli 1959 habe ich nach 2 Semestern das Vorphysikum, am 1.3.1961 nach weiteren 3 Semestern das Physikum bestand. Im März 1963 habe ich meine Dissertationsarbeit unter der Führung von Frau Priv.-Doz.Dr.Dr.Geldmacher-v.Mallinckrodt in der gerichtlichen Medizin zu Erlangen begonnen. Am 26.März 1965 habe ich das ärztliche Staatsexamen an der Universität Erlangen-Nürnberg, an der ich ohne Unterbrechung studiert habe, bestanden. Zur Zeit bereite ich mich für ein amerikanisches Examen, welches am 15.September 1965 stattfindet, vor.

Offsetdruck - Fotodruck

Josef Hogl

8520 Erlangen, Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz,) Tel. 22990

